

#13/18
03.23.02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Klaus Unsicker, Jens Pöhl, Michael Paulista and Rolf Bechtold

Application No.: 09/527,275

Group: 1646

Filed: March 17, 2000

Examiner: O. Chernyshev

For: Cytokines Having Neurotrophic Activity



CERTIFICATE OF MAILING	
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202	
on <u>MAR 13, 2002</u>	<u>Betsy S. Kirschner</u>
Date	Signature
<u>Betsy S. Kirschner</u>	
Typed or printed name of person signing certificate	

TECH CENTER 1600/2900

MAR 22 2002

RECEIVED

DECLARATION OF KLAUS UNSICKER UNDER 37 C.F.R. § 1.131

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

Sir:

I, Klaus Unsicker, a resident of Heidelberg, Germany, declare that:

1. I am a co-inventor of the above-referenced U. S. Patent Application.
2. I received a Doctor of Medicine from the University of Kiel, Germany. Since 1992 I have been employed at the Ruprecht-Karls-University of Heidelberg. I am currently leader of the Department of Neuroanatomy of the University of Heidelberg and hold the title of Professor of Anatomy & Cell Biology.
3. I have read U. S. Patent Application No. 09/527,275 and the Office Action mailed from the United States Patent and Trademark Office September 14, 2001.

4. I hereby state that the invention described and claimed in U.S. Patent Application No. 09/527,275 was completed in Germany, a World Trade Organization (WTO) member country, before June 5, 1997, the effective publication date of Louis, "Methods For Treating Photoreceptors Using Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Protein Product," WO 97/19694.
5. Completion is evidenced by the enclosed Exhibits A-C, which represent copies of laboratory notebook pages 269-280, 281 and 282-287, which demonstrate the following:
 - Exhibit A Pages 269-280 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of ciliar ganglion neurons (CG-Assay). This assay demonstrated the synergism of TGF- β with GDNF, which is also presented as Figure 6 in the present application.
 - Exhibit B Page 281 shows that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of paravertebral sympathetic neurons (Bio-Assay/SG-Assay). The combination of TGF- β and GDNF demonstrated a synergistic neurotropic effect on paravertebral sympathetic neurons.
 - Exhibit C Pages 282-287 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of sensoric spinal ganglion neurons (DRG-Assay). This assay demonstrated that the TGF- β and GDNF cytokine combination provided a synergistic neurotropic effect on dorsal root ganglion neurons.
6. In accordance with United States Patent and Trademark Office procedures, the dates recorded on these laboratory notebook pages have been redacted.

7. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information or belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under § 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements, if made, may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Klaus Unsicker

Date

CG - Assay:

2 Platten

Proben: TGF β 1, GDNF, TGF β 1 + GDNF, F3, VP, VP + TGF β 1,
F3 + TGF β 1, F3 + GDNF, VP + GDNF, siehe Protokoll

ca. 1100 Zellen / well

CG - Assay:Stoppen der Platten mit Glutaraldehyd
(40mg/g gezüchtet)CG - Assay:

2 Platten

Proben: TGF β 1, GDNF, TGF β 1 + GDNF, F3, VP, F3 + GDNF,
VP + GDNF, F3 + TGF β 1, VP + TGF β 1, siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG - Assay:

Stoppen der Platten mit Glutaraldehyd

B49:

Überstand + Zellen

vom 25.06.

TCA - Fällg.

1.5 ml

200 μ l

PBS

+ TCA \rightarrow Protein - Pellet \rightarrow in Proteingenosser aufgenommenDB:50 μ l B49 Überstand bzw. Lyolat + 50 μ l DB-Puffer.Je 2 μ l N-glycosidase-F hinzugeben.

17h bei 37°C Inkubation

CG - Assay:

12 Platten

Proben: VP, F3, VP + α GDNF, VP + α TGF β 1, F3 + α TGF β 1, TGF β 1 + GDNF, siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

EXHIBIT

A

SDS - PAGE+
Western - Blot

15% T Laemmli, red.

B49

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	LMU	/	G1	G2	G3	/	U	U/DG	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
/	LMU	/	G1	G2	G3	/	2	2/DG	/
/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$$U = 125V; \quad I_A = 70 \text{ mA}; \quad I_E = 32 \text{ mA}$$

$$t = 14.15'$$

15' Äquilibrieren in Transferruffer; NC-Membran + Gel

Blot: 15' = t; $U = 9-12V$; $I = 0.22A$

2-3' Ponceau-S

1h Block

1. AK

C6-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

W-Blot:3 x 10' Flaschen mit TTBS
2. AK (1:5000)Chromaffine:

2 NN → Mark → Präparation siehe Protokoll

→ 178 · 10⁶ Zellen → 25 Flaschen
(1:5) → 1.4 · 10⁶ Zellen / FlascheU-Blot:3 x 10' Flaschen mit TTBS
→ ECL

(PAGE v. 19.07.)

10

G /

2 /

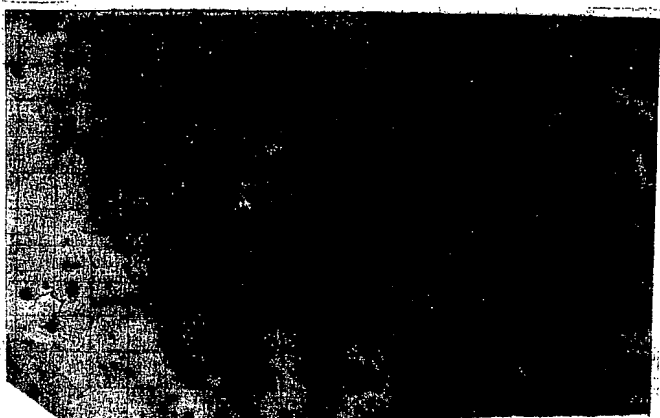
16 /

2 /

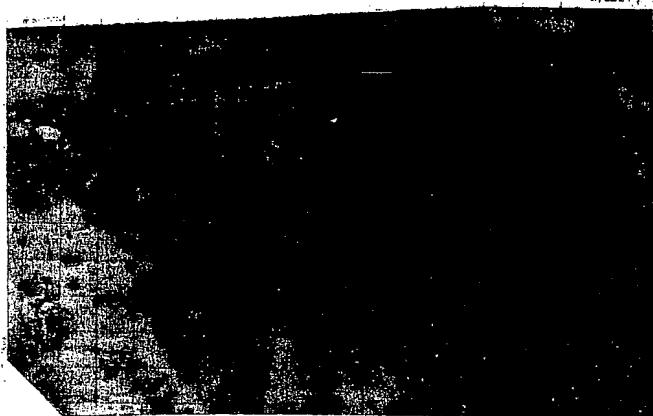
Üfstand

Lysoz

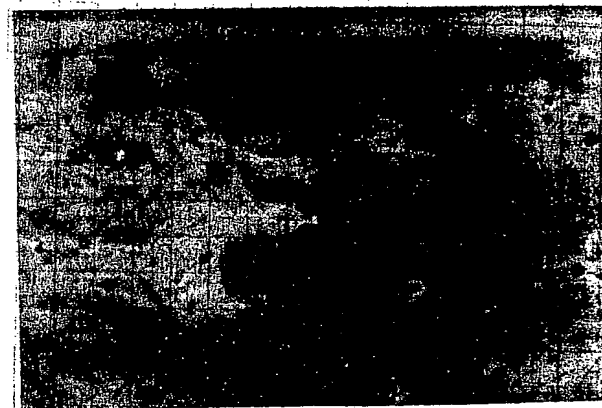
Bel



15'



3'



B49: Üfstand + Zellen

Stimulierung:

30h → mit

- a) 10 μ M Acetylcholin + 10 μ M Escin n=10
- b) 50 μ M Nicotin n=5
- ~~2~~ 2 Kontrollen für b) 4 Kontrollen für a)

- Durchführung:
- i) 2 ml Medium
 - ii) 15' Stimulierung → Medium (daron 1 2 μ l Stabilisierungspuffer für HPLC)
 - iii) 10' Lyoc → H₂O

272 CG-Assay:

2 Platten
Prob

F3, VP, F3 + TGF β 1, GDNF, F3 + TGF β 1 + GDNF
VP + TGF β 1, VP + GDNF, VP + GDNF + TGF β 1, TGF β 1 + GDNF
TGF β 1 + GDNF; F3 + α GDNF, F3 + α TGF β 1; VP + α TGF β 1;
VP + α TGF β 1; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2 Platten

Proben: GDNF, TGF β 1, FGF-2, ~~WNT3~~ Kombinationen;
siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

Chromaffine:

1 NN \rightarrow Mark \rightarrow Präp nach Protokoll
 \rightarrow 428.000 Zellen / CS \rightarrow $856 \cdot 10^4$ Zellen
auf Cover slips ausgesät für EM
(ca. 2ml eingefroren)

CG-Assay:

1e Platte
~~Proben:~~

unbelagt bzw. zu wenig

CG-Assay:

2 Platten

Proben: F3, VP, α TGF β 1, α GDNF, TGF β 1, GDNF
D1-5, I1-3, II1+2, II1+2, IV1-3 ACA-Fractionen
siehe Protokoll
(ca. 1200 Zellen / well)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2e Platte
Proben: D2+3, II1, IV1, F3, GDNF, TGF β 1; siehe Protokoll

Protein-Fällg: Chromaffine vom 25.05. und vom 11.07.
Überstand nach Stimulierung und Lyolat

Protokoll \rightarrow 3000 rpm (Heraeus) für 30' \rightarrow Überstand
Max. rpm (---) für ca. 1h \rightarrow ---
10% TCA Endkonzentration \rightarrow Vortex \rightarrow für 1h (oder 1/2h)
auf Eis \rightarrow 4000 rpm (Heraeus) für 15' \rightarrow Pellet
je 1ml Aceton \rightarrow 4000 rpm (Heraeus) für 15' \rightarrow
je 1ml MeOH \rightarrow 4000 rpm (---) für 15'

Pellet in Proteinpuffer aufschwemmen (4-6H Harnstoff)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

SDS-PAGE: 15% TLaemmli, red.

U-Block

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chr. 25.05.	/	LMW	/	G1	G2	G3	/	U	Lyolat	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chr. 11.07.	/	LMW	/	G1	G2	G3	/	U	Lyolat	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$U = 125V$; $I_A = 76mA$; $I_E = 35mA$; $t = 1h 20'$

Äquilibrieren der NK-Membran + Gel für 15' in Transferpuffer

Blot: $t = 15'$; $I = 0.22A$; $U = 9-12V$

1h Block; 1. AK

W-Blot: 3×10^6 mit TTBS waschen ; 2. Ak

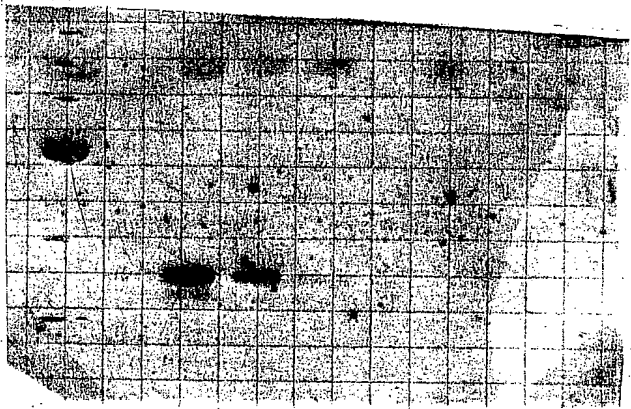
Chrom: Präparation nach Protokoll ; 2 Nebenlinien
 $\rightarrow 176.25 \cdot 10^6$ Zellen $\rightarrow 1.175 \cdot 10^6$ Zellen / Flasche

U-Blot: 3×10^6 mit TTBS waschen \rightarrow ECL

94
67
63
10
70
110

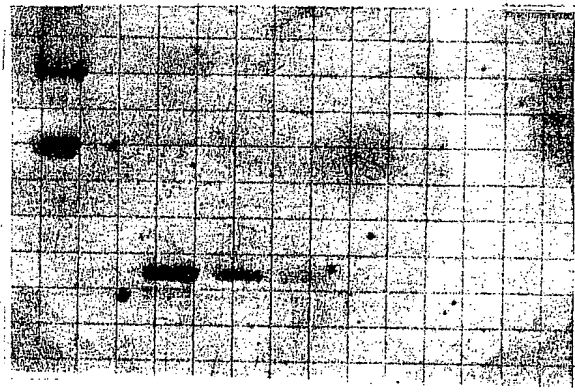
11
11
11
11
11
11

25.05.

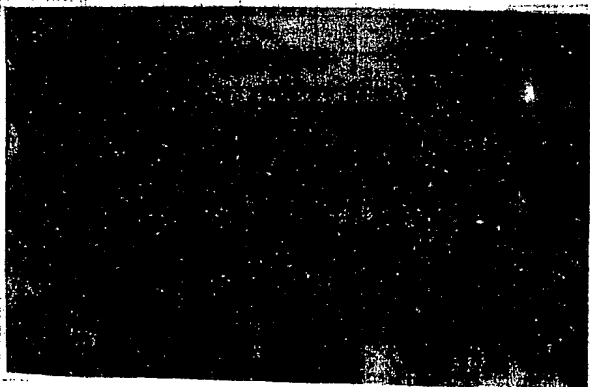
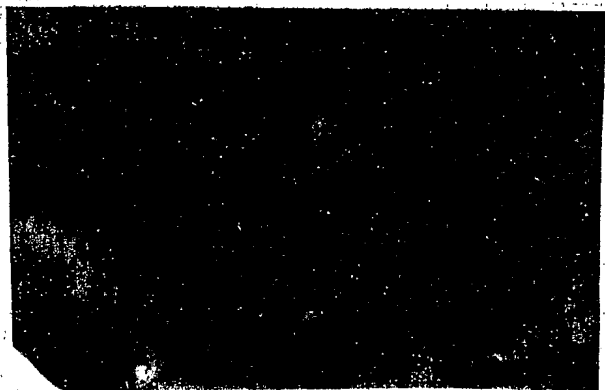


13

11.07.



33



CG-Assay:

2 Platten

Proben F3;

TGF β 1;

GDNF;

 α TGF β ;

GDNF;

F&F-2;

Antragungen siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

Stimul.

(ca. 2:00 Uhr)

30 h

→

Stimulierung mit

10 μ M Acetylcholin + 10 μ M Serin

Medium: 2 ml

Stimulierung:

2 ml

davon 100 μ l + 2 μ l Stabilisierungs-

puffer für HPLC

15' = t

Lyse:

2 ml

H₂O

;

t = 10'

(+ Zellen)

CG-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay:

2 Platten

Proben: TGF β 1;

GDNF;

Antragungen siehe Protokoll

ca. 1300 Zellen / well

CF-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

Protein-Fällg.:

Chromatinn:

lysiert und

Überstand nach Stimulierung.

- 30' bei 3000 rpm (Heraeus) → Überstand
- Maximale rpm (Heraeus) für ca. 1 h → Überstand
- 10% TCA - Endkonzentration → Vortex → für 1 h auf Eis
- 15' bei 4000 rpm (Heraeus) → Pellet
- je 1 ml Aceton → 15' bei 4000 rpm (Heraeus)
- je 1 ml MeOH → --

Pellet in Proteinpuffer + ca. 618 M Harnstoff aufnehmen

SDS-PAGE

SDS-PAGE

+

Western-Blot

15% T - Laemmli, red.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GL 1+2	/	LMH	/	G1	G2	G3	G4	G5	G6	/
	/	5	/	10						10

$$t = 14 \text{ } 15'$$

Western - Blot : 1. Amersham NC-membran
2. Bio Rad

15' Äquilibration

15' Blot ($I = 0.2 \text{ A}$; $U = 12-18 \text{ V}$)

60' Block

1. 4K

CG - Assay : CNT F + AK's
F3, V1 + AK's Anfragerung siehe Protokoll
→ 4th !

CG - Assay : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG - Assay : 2 Platten

G + T ↓ und T + G ↓ → Ausgang : 2n₀ / ml
Anfragerung siehe Protokoll
Auswertung ---

CG - Assay : Stoppen mit Glutaraldehyd

Western Blot : 3x Waschen für 10' mit TTBS
2. AK

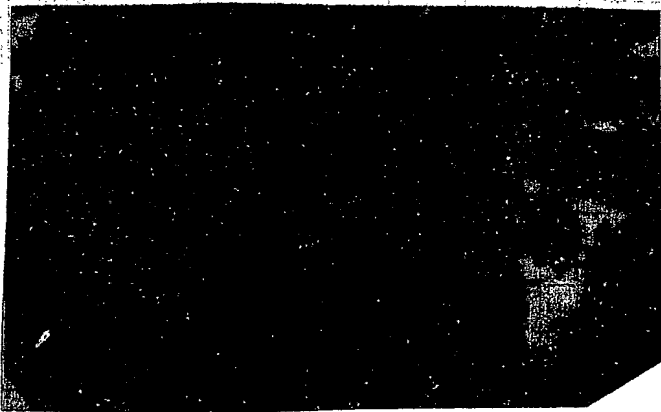
Western Blot: 5x 10' Versuchen mit TTBS
ECL

Amersham

Bio Rad



1'



3'

B49: Uferstand → Dialyse

Uromaffine: Präparation und Aufarbeitung nach Protokoll
→ 21.5 · 10⁶ Zellen

CG- Assay : 2 Platten

Proben: T+G↓ und G+T↓ (Ausgang: 2ng/ml)

Anfraging und Auswertung siehe Protokoll

Chromaffine
(3:00 Uhr)

nach 30h Stimulation mit $10\mu\text{M}$ Acetylcholin + $10\mu\text{M}$ Eserin

Medium : 2ml

Stimulation : 2ml (davon $100\mu\text{l}$ + $2\mu\text{l}$ Stabilisierungspuffer für HPLC) ; $t = 15'$

Lyse : 2ml H_2O ; $t = 10'$ 1 + Zellen $\rightarrow -80^\circ\text{C}$

CG- Assay : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG- Assay :

2 Platten

Proben: CNTF, T3, VP (+ Akt's)

Anfraging + Auswertung siehe Protokoll

CG- Assay :

Stoppen mit Glutaraldehyd

SDS-PAGE

Western Blot

15% T-Laemmli, red.

1. NC-Membran Bio Rad
2. - - - - - Millipore

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LMW (kDa)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 (4)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

$t = 14-15'$

$U = 125\text{V}$

80+ : 15' = t < 15' equil.
60' block → 1. Akt

2H Ezrin

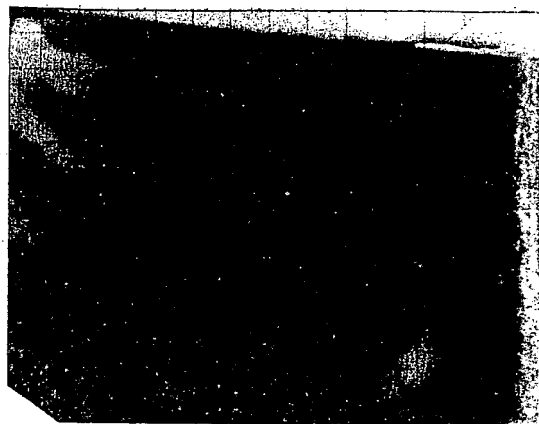
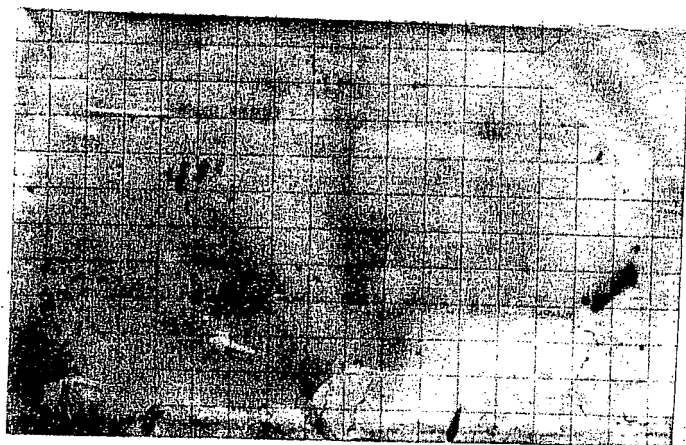
ilisiungs

1 - 1000

50°C



1'



3'

CG - Assay:

versch. FCS - Chargen (+ GDNF)
Anstrahlung + Auswertung siehe Protokoll

CG - Assay:

Stoppen mit Fluoracetaldehyd

Western - Blot:

3 x 10' Waschen mit TTBS
2.4K

SP - PAGE

+

Western Blot

NT - Lammli red.

1. NC - Membran Bio Rad
2. -11- Amersham

Gel 1+2

1 2 3 4 5 6 7 8 10

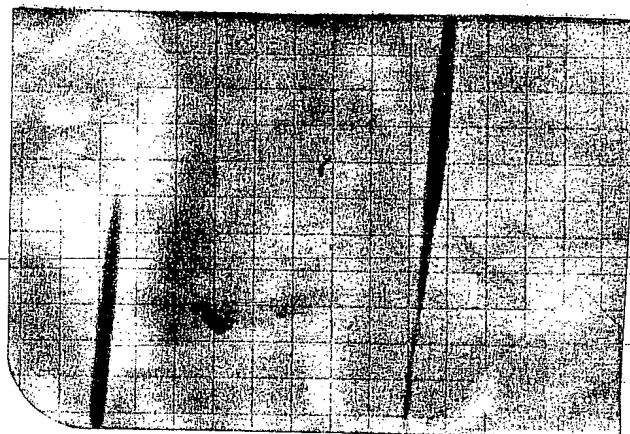
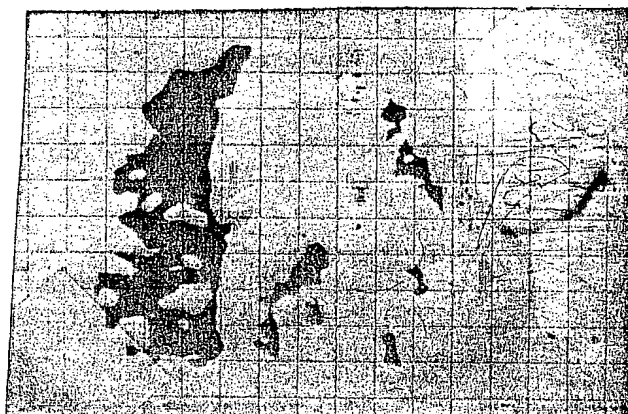
/ RM / GA G2 G3 G4 G5 G6 /

/ 4 / 10 ← ————— → 10 /

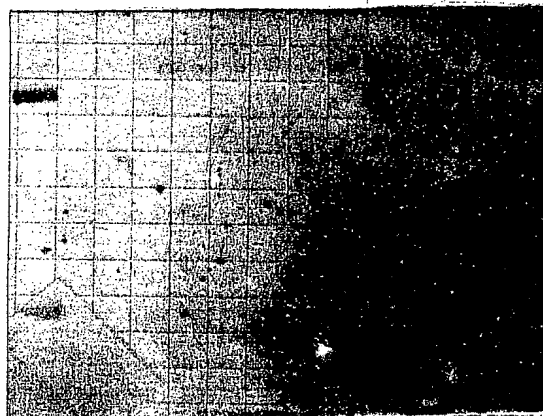
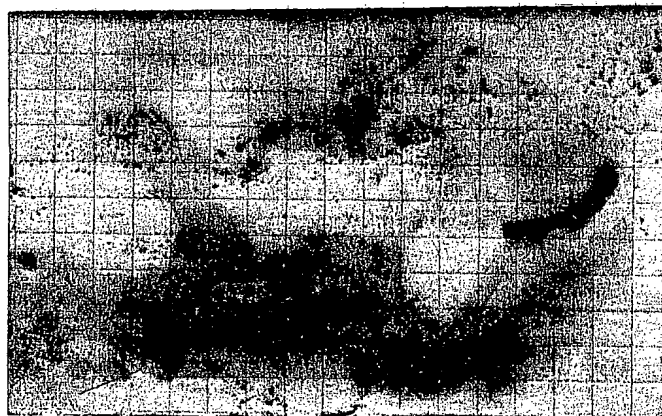
 $t = 14 \text{ } 15'$ $U = 125V$

Bio Rad

Amersham



1'



3'

Blot:

 $t = 15'$ $t = 15'$ $t = 60'$

1.4K

Agarose 4m

Blot

Block

 $I = 0.2A ; U = 12-18V$

Western Blot : 3x 10' Waschen mit TTBS
I. AK

Western Blot : 3x 10' Waschen mit TTBS

ECL

CG - Assay : A) "normal" 2 Platten
B) nach "MN - Behandlg."

A) 127.500 Zellen → 1275 Z/well
B) 262.500 " → MN - Beh. → 97.000

Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

(MN - Beh.: BSA - Kissen, Putrizanide, BSA - K., panning)

MLEC - Assay : 12 Platte
Zellen angest. 3h Ink.: Protein aufgetragen
über Nacht ink.
Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

CG - Assay : Stoppen mit Fluoriddehydrat

Western - Blot : 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

MLEC - Assay : 1x Waschen mit PBS
Lyse Puffer (100 µl/well) für 2-3h bei RT
80 µl Lyse ablesen und messen - siehe Protokoll

Bio - Assay : CG E12 / SG E12 / SG E8
Proben: TGF β 1 ; GDNF; ~~WNT~~ siehe Protokoll

CG/E12: 155.000 Zellen → 1290 Zellen/well → Stop 12-09
SG/E12: 345.000 " → 3450 Zellen/well → } Stop 14-09
SG/E8: 132.500 " → 1950 Zellen/well

EXHIBIT

SG: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG: FCS: verschiedene Chargen
TGF β 1 ; GDNF

nichtes Protokoll

165.000 Zellen \rightarrow 1375 Zellen/well

Bio-Assay: CG / DRG / SG : E12
 \downarrow \downarrow \downarrow
18-09 19-09 20-09

nichtes Protokoll

Stop

CG:	155.000	Zellen	\rightarrow	1290	} Zellen/well
DRG:	142.500	"	\rightarrow	1190	
SG:	177.500	"	\rightarrow	1480	

Problem: TGF β 1 ; GDNF

SDS-PAGE : 15.0% T Lämmli ; red.

Western Blot

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RM	/	G1	G2	G3	F	DRG/F	G3	/
/	4	/	\leftarrow	10	\rightarrow	\leftarrow	20	\rightarrow	10

$t = 1h 25'$ $U = 125V$ $I_A = 66mA$ $I_E = 33mA$

Blot : $t = 15'$ \bar{a} quilibrium
 $t = 15'$ bloßen
 $t = 60'$ Blocklösg.
n. Ak

$I = 0.2A$; $U = 18-19V$

EXHIBIT

C

2.5'

1'

CG: Stoppen mit Glutaraldehyd

Bio-Assay:

DRG / E8 → Stop 20-09

nicht protokolliert

CG / DRG / SG E12

-11-

↓ ↓ ↓
19-09 20-09 21-09 Stop

DRG / E8: 160.000 Zellen → 1300 Zellen / well

CG / E12 100.000 -11- → 1250

DRG / E12 180.000 -11- → 1125

SG / E12 260.000 -11- → 1300

} Zellen / well

Western-Blot:

3x 10' Säcken mit TTBS
2. AK

Bio-Assay:

CG / DRG / SG E12
21-09 22-09 23-09

Stop

nicht protokolliert

CG 110.000 Zellen → 1375 Zellen / well

DRG
SG11.00
290.000Zellen
-11-→
→1400
1320

ellen/well

Western Blot:3x Flaschen je 10' mit TTBS
ECLBio - Assay:(2x) DRG / SG E8
25-07 26-07

Stop

siehe Protokoll

DRG	:	332.500	Zellen	→	1385	} Zellen/well
SG	:	49.500	-11-	→	820	

Bio - Assay:CG / DRG E10
26-07 27-07

Stop

DRG / E14 rat

27-07 Stop

siehe Protokoll

CG	E10	135.000	Zellen	→	1125	Zellen/well
DRG		79.968	-11-	→	1176	-11-
DRG	E14 rat	156.000	-11-	→	1300	-11-

Bio - Assay:CG / DRG E10
28-07 29-07

Stop

siehe Protokoll

CG	125.000	Zellen	→	1250	Zellen/well
DRG	135.000	-11-	→	1350	-11-

Bio - Assay:CG / DRG / SG E8
08-10 09-10 10-10

Stop

siehe Protokoll

CG: 255.000 → 1275
 DRG: 125.000 → 1170
 SE: 80.000 → 1180 } Zellkultur

DG: 20%HS + 20%FCS

20 µl Serum + 80 µl Protein buffer + 2 µl 7-Glycanase
 17h bei 37°C inkubieren → Stop 09-10

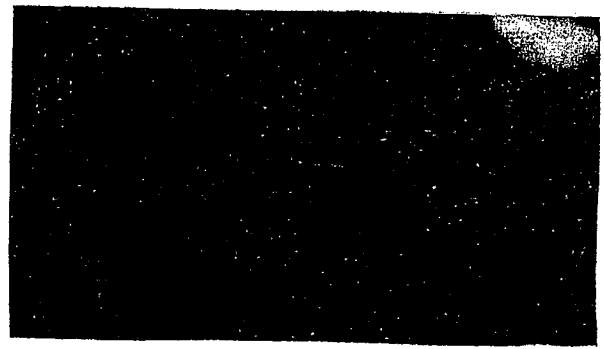
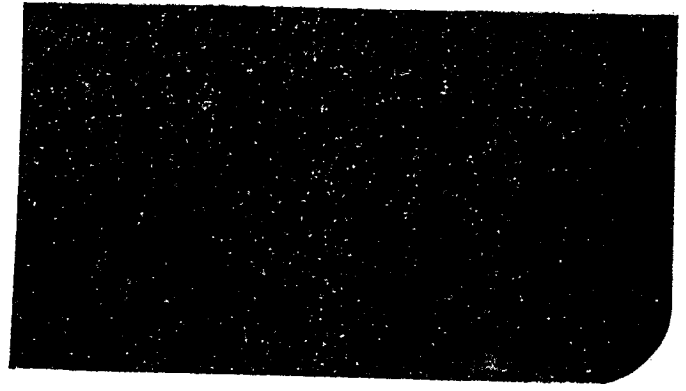
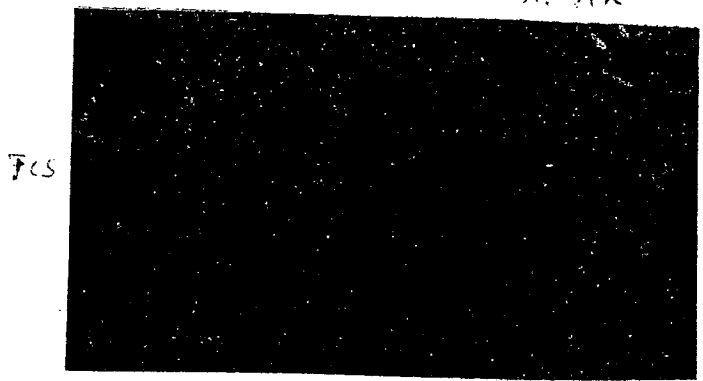
SDS-PAGE
 +
Western Blot

15% T Laemmli, red

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RH	/	G1	G2	G3	/	HS	DG HS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/
/	RH	/	G1	G2	G3	/	FCS	DG FCS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/

t = 1h 20' U = 125V I_A = 76 mA I_E = 39 mA

Slot: t = 15' Agglutination
 t = 15' ; I = 0.2 A ; U = 13-17V Slot
 t = 60' Block
 1. AK



Bio - Assay:

E10

stop: 12-10

siehe Protokoll

SG: 225.000 Zellen → 1400 Zellen/well

Western-Blot:3x 10' mit TTBS waschen
2. AKWestern-Blot:3x 10' mit TTBS waschen
ECLBio - Assay:

SG / E12

siehe Protokoll

SG: 270.000 Zellen → 1350 Zellen/well
stop: 14-10Bio - Assay:

CG / DRG E8

siehe Protokoll

15-10

16-10

stop

CG: 152.500 Zellen	→	1270	} Zellen/well
DRG: 160.000 -"-	→	1333	

Bio - Assay:

SG / E8

→ stop: 19-10

CG / DRG / SG E10

17-10 18-10 19-10

stop

} siehe Protokoll

SG / E8:

92.500 Zellen → 1160 Zellen/well

CG

110.000

-"-

→ 1100

DRG / E10

130.000

-"-

→ 1080

SG

115.000

-"-

→ 1150

} Zellen/well

Bio - Assay:

CG / DRG / SG E8
22-10 23-10 24-10

Stop

siehe Protokoll

CG	120.000	Zellen	→	1200	} Zellen / well
DRG	100.000	-"-	→	1250	
SG	120.000	-"-	→	1200	

Bio - Assay:

CG / DRG / SG E10
24-10 25-10 26-10

Stop

siehe Protokoll

neues BSA

④ = CNTF 10 ng/ml

CG	100.000	Zellen	→	1250	} Zellen / well
DRG	130.000	-"-	→	1300	
SG	175.000	-"-	→	1250	

Bio - Assay:

CG / DRG / SG E12
26-10 27-10 28-10

Stop

siehe Protokoll

CG:	75000	Zellen	→	1100	} Zellen / well
DRG:	120.000	-"-	→	1200	
SG:	185.000	-"-	→	1520	

Bio - Assay:

CG / DRG / SG E9
31-10 1-11 2-11

Stop

siehe Protokoll

CG:	115.000	Zellen	→	1440	} Zellen / well
DRG	125.000	-"-	→	1250	
SG	130.000	-"-	→	1300	

Bio - Assay:

CG / DRG / SG E10
1-11 2-11 3-11

Stop

siehe Protokoll

CG	110.000	Zellen	→	1250	} Zellen / well
DRG	125.000	-"-	→	1250	
SG	120.000	-"-	→	1200	